



⑯ BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES

PATENTAMT

# Offenlegungsschrift

⑯ DE 41 07 154 A 1

⑯ Int. Cl. 5:

C 07 K 15/28

A 61 K 39/395

A 61 K 49/00

G 01 N 33/574

DE 41 07 154 A 1

⑯ Aktenzeichen: P 41 07 154.9

⑯ Anmeldetag: 6. 3. 91

⑯ Offenlegungstag: 16. 4. 92

⑯ Innere Priorität: ⑯ ⑯ ⑯

11.10.90 DE 40 32 312.9

⑯ Anmelder:

Boehringer Mannheim GmbH, 6800 Mannheim, DE

⑯ Vertreter:

Weickmann, H., Dipl.-Ing.; Fincke, K., Dipl.-Phys.  
Dr.; Weickmann, F., Dipl.-Ing.; Huber, B.,  
Dipl.-Chem.; Liska, H., Dipl.-Ing. Dr.-Ing.; Prechtel,  
J., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat., Pat.-Anwälte, 8000  
München

⑯ Erfinder:

Brandt, Michael, Dipl.-Chem. Dr., 8127 Iffeldorf, DE;  
Endl, Josef, Dipl.-Biol. Dr., 8120 Weilheim, DE;  
Jungfer, Herbert, Dr., 8130 Starnberg, DE; Albert,  
Winfried, Dipl.-Chem. Dr., 8121 Ebering, DE

⑯ Monoklonale Antikörper gegen Melanom

⑯ Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von humanen, gegen Melanom gerichteten Antikörpern, worin man ohne vorherige Immunisierung B-Lymphozyten aus einer gesunden Person isoliert, die isolierten B-Lymphozyten immortalisiert, Antikörper aus den immortalisierten B-Lymphozyten durch immunhistochemische Analyse auf Bindung gegen primäres Melanom oder/und Melanom-Metastasen untersucht, die positiv reagierenden B-Lymphozyten-Klonen auswählt, kultiviert und daraus monoklonale Antikörper gewinnt. Weiterhin werden die durch das erfindungsgemäße Verfahren hergestellten Antikörper beansprucht.

DE 41 07 154 A 1

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von humanen Antikörpern, die gegen Melanom gerichtet sind, die durch das erfindungsgemäße Verfahren erhaltenen Antikörper sowie deren Verwendung.

Melanom, ein Tumor der Haut, ist ein äußerst aggressiver Tumor. Insbesondere metastasierende Melanome sind mit konventionellen Methoden kaum mehr erfolgreich zu behandeln. Es ist daher ein großes Bedürfnis, neue Therapeutika zu finden, die für eine Behandlung von Melanomen geeignet sind.

Dippold et al. (Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77 (1980), 6114 – 6118) berichteten über die Herstellung von murinen monoklonalen Antikörpern gegen Melanom. Einer der dort offenbarten Antikörper ist gegen das Gangliosid GD3 gerichtet. In J.Biol. Chem. 262 (1987), 6802 – 6807 sind ebenfalls murine monoklonale Antikörper gegen Melanom beschrieben. Diese binden gleichermaßen an GM3 und GM2, aber nicht an GD3.

1982 berichteten Irie et al (Proc.Natl.Acad.Sci USA 79, 5666 – 5670) über die Herstellung humaner monoklonaler Antikörper, die mit Melanom reagieren. Die dort offenbarten monoklonalen Antikörper reagieren mit den Gangliosiden GM2 bzw. GD2. In Proc.Natl.Acad.Sci. USA 84 (1987), 2416 – 2420 sind ebenfalls humane monoklonale Antikörper gegen Melanom beschrieben. Diese binden stark an GD3 und GD2 bzw. GM3 und GD1a. In Cancer Research 49 (1989), 191 – 196 sind ebenfalls humane monoklonale Antikörper gegen Melanom beschrieben. Diese binden stark an GM3 und GD1a bzw. GD3 und GD2. Die zur Herstellung dieser monoklonalen Antikörper verwendeten Lymphozyten stammen von Melanom-Patienten.

Diese in der Literatur beschriebenen monoklonalen Antikörper wurden entweder von Melanom-Patienten mit oder ohne Immunisierung oder durch und nach Immunisierung von Labortieren erhalten. Derartige Versuchsansätze zur Gewinnung von auch *in vivo* gegen Melanom wirksamen Antikörpern weisen jedoch große Nachteile auf. Murine monoklonale Antikörper haben den Nachteil, daß sie vom humanen Immunsystem als Fremdproteine erkannt werden und daher Antikörper gegen diese Fremdproteine gebildet werden. Dies bedeutet, daß solche monoklonalen Antikörper schneller eliminiert werden und damit in ihrer Wirksamkeit eingeschränkt sind. Aber auch bei Antikörpern, die aus Tumor-Patienten gewonnen wurden, bestehen große Zweifel an ihrer Wirksamkeit, da gerade bei Tumor-Patienten die Funktionsfähigkeit des Immunsystems nicht gegeben ist. Überdies erkennen die Antikörper des Standes der Technik bei weitem nicht alle primären Melanome und auch nur einen geringen Anteil von Melanom-Metastasen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, Antikörper gegen Melanom bereitzustellen, bei denen die Nachteile des Standes der Technik mindestens teilweise beseitigt sind.

Die erfindungsgemäße Aufgabe wird gelöst durch Bereitstellung eines Antikörpers gegen Melanom, der dadurch gekennzeichnet ist, daß er an die Ganglioside GM3 und GD3 bindet, im wesentlichen aber nicht an die Ganglioside GM1, GM2, GD1a, GD1b und GD2 bindet, wobei die Bindung des Antikörpers an die Ganglioside durch Immunfärbung nach dünnenschichtchromatographischer Auf trennung der Ganglioside bestimmt wurde.

Die erfindungsgemäßen Antikörper, bei denen es sich vorzugsweise um humane Antikörper handelt, sind erhältlich durch ein Verfahren, wobei man ohne vorherige Immunisierung B-Lymphozyten aus einer gesunden Person isoliert, die isolierten B-Lymphozyten immortalisiert, Antikörper aus den immortalisierten B-Lymphozyten durch immunhistochemische Analyse auf Bindung gegen primäres Melanom oder/und Melanom-Metastasen untersucht, die positiv-reagierenden Klone auswählt, kultiviert und daraus monoklonale Antikörper gewinnt.

Die Gewinnung von gegen Melanom gerichteten Antikörpern aus gesunden Personen, die nicht an Melanom erkrankt sind, ist völlig überraschend. Vorzugsweise wählt man als Donor für die B-Lymphozyten eine gesunde Melanom-Risikoperson aus. Unter einer Melanom-Risikoperson ist z. B. ein Mensch mit einem Sonnenbrandrisiko zu verstehen, d. h. ein hellhaariger oder hellhäutiger Mensch, gegebenenfalls mit Sommersprossen, der zuvor (besonders bevorzugt über einen längeren Zeitraum hinweg) einer intensiven UV-Bestrahlung ausgesetzt war. Die Eignung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Gewinnung von humanen, gegen Melanom gerichteten und auch wirksamen Antikörpern läßt sich möglicherweise darauf zurückführen, daß anscheinend in jeder Person ständig Zellen entarten, wodurch Melanomzellen entstehen, die aber vom körpereigenen Immunsystem erfolgreich bekämpft werden können.

Der erste Schritt des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Gewinnung von B-Lymphozyten aus dem Blut einer gesunden Person. Eine "gesunde Person" im Sinne der vorliegenden Erfindung ist als Mensch definiert, der keine Symptome eines Melanoms zeigt. Dies kann nach an sich bekannten Methoden erfolgen. Anschließend erfolgt die Immortalisierung der Lymphozyten. Dafür stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Die B-Lymphozyten können mit Myelomzellen humarer oder muriner Herkunft nach der Methode von Köhler und Milstein fusioniert werden. Zur Fusion können aber auch Heteromyelome verwendet werden. Ebenso ist es möglich, die B-Lymphozyten mittels Epstein-Barr-Virus zu transformieren. Weiterhin kann das in der DE-A 32 45 665 oder das in der EP-A 02 56 512 beschriebene Verfahren verwendet werden. Dabei wird mit subzellulären Vesikeln, die eine transformierende DNA enthalten, fusioniert.

Von den immortalisierten B-Lymphozyten werden diejenigen ausgewählt, die Antikörper mit der gewünschten Reaktivität gegen Melanom produzieren. Die Selektion der B-Lymphozyten auf Sekretion von Antikörpern, die gegen Melanom gerichtet und auch gegen Metastasen wirksam sind, erfolgt erfindungsgemäß durch immunhistochemische Analyse auf Bindung gegen Melanom-Gewebeschnitte, wobei man primäres Melanom oder/und Melanom-Metastasen verwenden kann. Vorzugsweise wird die immunhistochemische Analyse der Antikörper durch Bindung an Melanom in Gewebeschnitten mittels eines ELISA-Tests in Anlehnung an die Methode von Nielsen et al. (Hybridoma 6 (1987), 103 – 109) untersucht. Auf diese Weise positiv ermittelte B-Lymphozyten werden ausgewählt, nach üblichen Verfahren gezüchtet und daraus nach dem Fachmann bekannten Methoden monoklonale Antikörper gewonnen.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren ist es möglich, Antikörper gegen Melanom zu erhalten, die auch eine

sehr hohe Reaktivität gegen Melanom-Metastasen besitzen. Somit beinhaltet die vorliegende Erfindung auch humane Antikörper gegen Melanom, die in Gewebeschnitten auch an mindestens 70% der Melanom-Metastasen binden.

Ein erfundungsgemäßer Antikörper ist dadurch gekennzeichnet, daß er an die Ganglioside GM3 und GD3 bindet, im wesentlichen aber nicht an die Ganglioside GM1, GM2, GD1a, GD1b und GD2 bindet. Dies bedeutet, daß die erfundungsgemäßen Antikörper an die Ganglioside GM1, GM2, GD1a, GD1b und GD2 mit einer Affinität von höchstens etwa 5% bezüglich der Affinität für das Gangliosid GM3 oder das Gangliosid GD3 binden. Die Bestimmung der Bindefähigkeit der erfundungsgemäßen Antikörper an die Ganglioside erfolgt durch Immunfärbung nach dünnenschichtchromatographischer Auftrennung der Ganglioside. Durch dieses Verfahren ist es auf zuverlässige Weise möglich zu entscheiden, ob ein spezifisches Gangliosid an einen Antikörper bindet oder nicht. Weniger bevorzugt ist die Bestimmung der Affinität eines Antikörpers nach der Methode des ELISA-Tests. Bei dieser Methode können unspezifische Bindungen nicht ausgeschlossen werden, so daß die Möglichkeit von falsch-positiven Ergebnissen besteht. Diese falsch-positiven Ergebnisse würden sich in einer geringen Bindungssaffinität an Ganglioside äußern, bei denen nach dem anderen oben beschriebenen Verfahren keine Bindung festzustellen ist.

Beispiele für Antikörper, die mit Hilfe des erfundungsgemäßen Verfahrens gewonnen werden können, sind die monoklonalen Antikörper "17" und AH18, sekretiert von den Hybridomzelllinien ECACC 9 00 90 703 und ECACC 9 00 90 701. Diese Antikörper sind von der Klasse IgM.

Überraschenderweise wurde auch festgestellt, daß erfundungsgemäße Antikörper nicht nur an Melanom, sondern auch an andere Tumorgewebe, insbesondere Lungen- und Brustkarzinomgewebe binden können. Ein Beispiel hierfür ist der erfundungsgemäße Antikörper "17".

Weiterhin beinhaltet die vorliegende Erfindung Derivate von erfundungsgemäßen Antikörpern, die deren Bindungsspezifität besitzen, jedoch Modifikationen in dem nicht für die Antigenbindung wesentlichen Bereich aufweisen. Diese Antikörperderivate können etwa aus den erfundungsgemäßen Antikörpern durch Austausch einer oder mehrerer konstanter Domänen oder/und Verknüpfung mit einem anderen Molekül erhalten werden. So kann z. B. ein Austausch von konstanten Domänen für einen Isotype-Switch durchgeführt werden, wo z. B. ein Antikörper der Klasse IgM in einen Antikörper der Klasse IgG unter Beibehaltung seiner Antigen-Spezifität überführt werden kann. Dieser Isotype-Switch kann durch zellbiologische oder molekularbiologische Methoden erfolgen, die dem Fachmann bekannt sind (z. B. Rothman P. et al, Mol.Cell.Biol. 10 (1990), 1672 – 1679).

Der monoklonale Antikörper gemäß vorliegender Erfindung kann jedoch auch mit einem anderen Molekül, insbesondere einem Marker oder einem Toxin verknüpft werden, wodurch seine diagnostische oder therapeutische Verwendbarkeit verändert wird. Geeignete Verfahren zur Verknüpfung von Markern (z. B. Enzymen wie Peroxidase) oder Toxinen (z. B. Ricin, Choleratoxin) mit dem Antikörper bzw. die radioaktive Markierung sind dem Fachmann bekannt.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung eines erfundungsgemäßen Antikörpers zur Diagnose oder Therapie von Melanom, insbesondere zur passiven und aktiven Immunisierung von Melanompatienten. Vorzugsweise verwendet man dabei den von der Zelllinie ECACC 9 00 90 703 sekretierten Antikörper "17" oder/und den von der Zelllinie ECACC 9 00 90 701 sekretierten Antikörper AH18.

Da die nach dem erfundungsgemäßen Verfahren erhaltenen monoklonalen Antikörper an lebende Melanomzellen und andere Tumorzellen binden, können sie auch zur Bekämpfung dieser Zellen im Organismus eingesetzt werden. Somit beinhaltet die vorliegende Erfindung auch ein Arzneimittel, das aus einem oder mehreren erfundungsgemäßen Antikörpern, gegebenenfalls zusammen mit üblichen pharmazeutischen Träger-, Hilfs-, Füll- und Zusatzstoffen besteht. Die Verabreichung eines erfundungsgemäßen Arzneimittels ist sowohl zur Vorbeugung als auch nach einer Metastasierung eines Tumors, insbesondere eines Melanoms möglich. Eine zur passiven Immunisierung geeignete Dosis der erfundungsgemäßen Antikörper liegt im Bereich von 1 bis 200 mg, wobei diese Dosis gegebenenfalls wiederholt zu verabreichen ist. Die monoklonalen Antikörper können lokal in das Melanom, wie von Irie und Morton (Proc.Natl.Acad.Sci. USA 83 (1986), 8694 – 8698) beschrieben, verabreicht werden. Nach Metastasierung des Melanoms ist jedoch eine, dem Fachmann geläufige systemische Verabreichung bevorzugt. Die erfundungsgemäßen Antikörper werden vorzugsweise alleine therapeutisch eingesetzt, können jedoch auch als Konjugate mit Toxinen, Therapeutika und ähnlichem verwendet werden.

Da die nach dem erfundungsgemäßen Verfahren gewonnenen Antikörper mit Melanomen und Melanom-Metastasen bindefähig sind, eignen sie sich auch hervorragend zum qualitativen oder quantitativen Nachweis von Melanom- und anderen Tumorzellen im Gewebe. Der Nachweis erfolgt dabei in an sich bekannter Weise durch ein immunologisches Bestimmungsverfahren. Verfahren dieser Art sind dem Fachmann geläufig und brauchen daher hier nicht mehr erläutert zu werden. Der erfundungsgemäß gewonnene Antikörper kann dabei als unmarkierter, markierter oder/und immobilisierter Rezeptor eingesetzt werden.

Die durch den monoklonalen Antikörper definierten Antigene bzw. Epitope können ebenfalls durch immunologische Bestimmungsverfahren in Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden. Die erfundungsgemäßen monoklonalen Antikörper können dabei als markierter oder/und immobilisierter Rezeptor eingesetzt werden. Für die Durchführung des Bestimmungsverfahrens sind viele Varianten bekannt, die alle geeignet sind. So können zwei oder drei oder auch mehr Rezeptoren verwendet werden und die Inkubation mit den einzelnen Rezeptoren kann in verschiedener Reihenfolge in homogener oder heterogener Phase erfolgen. Ausgewertet wird jeweils eine durch Bindung von mindestens zwei Rezeptoren mit der in der Probelösung nachzuweisenden Substanz erfolgende Signaländerung. Bevorzugt erfolgt die erfundungsgemäße Bestimmung entweder in homogener Phase, z. B. nach dem Prinzip des Agglutinationstests, wobei als Rezeptoren beschichtete Partikel wie z. B. Latex-Partikel oder Erythrozyten verwendet werden, die durch Bindung mit spezifisch bindefähigen Rezeptoren und der nachzuweisenden Zelle vernetzen und dadurch agglutinieren, oder in heterogener Phase, bevorzugt als Sandwich-Immunoassay. In jedem Falle werden mindestens zwei Rezeptoren  $R_1$  und  $R_2$  eingesetzt, von denen einer

5 einen erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper (z. B. "17") oder einen in äquivalenter Weise bindefähigen Antikörper oder ein Derivat davon enthält, während der andere Rezeptor einen anderen erfindungsgemäßen Antikörper (z. B. AH18) oder einen in äquivalenter Weise bindefähigen Antikörper oder ein Derivat davon enthält. Unter dem Begriff "in äquivalenter Weise bindefähiger Antikörper" werden Antikörper verstanden, bei denen eine Epitopüberlappung mit dem in Betracht kommenden Antikörper nachweisbar ist. Diese Epitopüberlappung kann mit Hilfe eines kompetitiven Testsystems nachgewiesen werden. Dazu wird z. B. mit Hilfe eines Enzym-Immunoassays überprüft, inwieweit ein Antikörper mit dem bekannten Antikörper um die Bindung an ein definierter Substrat bzw. ein spezielles Epitop konkurriert. Dazu inkubiert man eine, das entsprechende Substrat enthaltende Lösung mit dem erfindungsgemäßen Antikörper in markierter Form und einem Überschuß des in Betracht gezogenen Antikörpers. Durch Immobilisierung der gebildeten Komplexe, Trennung der festen von der flüssigen Phase und Nachweis der gebundenen Markierung in einer der beiden Phasen, kann dann leicht festgestellt werden, inwieweit der in Betracht gezogene Antikörper den definierten Antikörper aus der Bindung verdrängen kann. Ist eine Verdrängung von mindestens 50% bei 10<sup>5</sup>-fachem Überschuß gegeben, so liegt eine Epitopüberlappung vor und der entsprechende Antikörper ist zum Einsatz für das erfindungsgemäße Verfahren geeignet.

10 15 Bei Inkubation der Körperflüssigkeit mit den beiden Rezeptoren bilden sich nun Komplexe aus R<sub>1</sub>, Gangliosid und R<sub>2</sub>. Die Rezeptoren werden so ausgesucht, daß nur Komplexe, in denen sowohl R<sub>1</sub> als auch R<sub>2</sub> mit dem Gangliosid verbunden sind, eine Signaländerung ergeben, so daß auf diese Weise nur solche Ganglioside erfaßt werden, die mit den beiden spezifischen Antikörpern bindefähig sind.

20 25 Bevorzugt erfolgt die erfindungsgemäße Bestimmung als Sandwich-Immunoassay. Dazu wird Rezeptor R<sub>1</sub> immobilisiert oder immobilisierbar gemacht und mit der Probelösung umgesetzt. Anschließend wird Rezeptor R<sub>2</sub> zugegeben. Es bilden sich Komplexe aus dem immobilisierten Rezeptor R<sub>1</sub>, dem nachzuweisenden Gangliosid und Rezeptor R<sub>2</sub>.

25 30 Die erfindungsgemäßen Antikörper können auch zur Bestimmung eines prognostischen Index eingesetzt werden. Dabei wird nach einer Behandlung eines Melanom-Patienten festgestellt, ob die durch die monoklonalen Antikörper erkannten Antigene in den Körperflüssigkeiten, insbesondere im Serum des Patienten nach einer gewissen Zeit auftauchen oder verschwinden.

30 35 Schließlich beinhaltet die vorliegende Erfindung auch ein Verfahren zur Diagnose oder Therapie von Tumoren, insbesondere von Melanomen, wobei man einen oder ein Gemisch von mehreren erfindungsgemäßen Antikörpern, gegebenenfalls zusammen mit üblichen pharmazeutischen Träger-, Hilfs-, Füll- und Zusatzstoffen, vorzugsweise in einer Dosis von 1 bis 200 mg verabreicht.

35 40 Die in der Erfindung genannten Zelllinien ECACC 9 00 90 703 und ECACC 9 00 90 701, welche die Antikörper "17" und AH18 sekretieren, wurden am 07. September 1990 bei European Collection of Animal Cell Cultures, Porton Down (GB) hinterlegt.

40 45 Die Erfindung wird durch die folgenden Figuren und Beispiele erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 Reaktivität des monoklonalen Antikörpers "17" mit Melanom,

Fig. 2 keine Reaktivität des monoklonalen Antikörpers "17" mit normaler Haut.

#### Beispiel 1

40

#### Selektion auf Antikörper gegen Melanom

45 50 Einer gesunden Person werden 20 bis 200 ml Blut abgenommen und daraus die mononukleären Zellen isoliert. Anschließend werden diese Zellen nach herkömmlichen Methoden immortalisiert (Köhler/Milstein bzw. EBV-Transformation bzw. DNA-Transfektion). Nach 2 bis 4 Wochen werden die Kulturüberstände der immortalisierten Zellen getestet. Dazu wird ein ELISA-Test an humanen Gewebschnitten von Melanom durchgeführt. Dies geschieht in Anlehnung an die Methode von Nielsen et al. (Hybridoma 6 (1987), 103 – 109).

55 60 Es werden tiefgefrorene Tumorgewebe in 3 bis 5 µm dicke Scheiben geschnitten und auf mit Silan vorbehandelten Deckgläschern aufgebracht. Die Gewebschnitte können bei –80°C gelagert oder auch gleich verwendet werden. Dazu werden sie nach Bedarf für 10 Minuten bei –20°C in Aceton fixiert. Anschließend läßt man gegebenenfalls das Aceton abdampfen und taucht danach die Schnitte für ca. 3 Minuten in PBS (phosphatgepufferte Salzlösung). Nach Abtropfen der PBS werden 20 bis 30 µl eines Blockierungsantikörpers (Konzentration 40 µg/ml) aufgebracht. Dieser Blockierungsantikörper ist das Fab-Fragment eines polyklonalen Schaf-Serums oder eines murinen monoklonalen Antikörpers gegen humanen Fc<sub>µ</sub> bzw. Fc<sub>γ</sub>. Der Blockierungsantikörper wird für 1 bis 2 Stunden oder über Nacht bei Raumtemperatur bzw. bei 4°C auf den Schnitten inkubiert.

65 70 Anschließend wird der Schnitt 3x ca. 4 Minuten lang in PBS bei 4°C gewaschen. Dann wird die zu untersuchende Antikörperhaltige Lösung (d. h. die Kulturüberstände der immortalisierten Zellen) aufpipettiert. Nach mehrstündiger (üblicherweise 2-stündiger) Inkubation bei 4°C wird die Antikörper-haltige Lösung durch dreimaliges ca. 4 Minuten dauerndes Waschen in PBS weggespült. Anschließend wird der Schnitt mit dem gleichen Antikörper wie bei der Blockierung inkubiert, nur daß diesmal der verwendete monoklonale bzw. polyklonale Antikörper an Peroxidase gekoppelt ist (z. B. 2 U/ml). Es wird 1 Stunde bei 4°C inkubiert und anschließend, wie oben beschrieben, gewaschen. Dann werden die Objektträger in Substratlösung (z. B. Aminoethylcarbozol in DMSO/Tris HCl 50 mmol/l, pH 7,3) in Gegenwart von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eingetaucht und ca. 4 bis 5 Minuten inkubiert. Anschließend werden die Objektträger ca. 5 Minuten lang in PBS gewaschen.

75 80 Wenn gewünscht, können die Zellkerne in den Gewebschnitten mit Hämalaun (Merck) 1 : 3 verdünnt in H<sub>2</sub>O gegengefärbt werden. Dazu werden die Objektträger für ca. 20 Sekunden in die Hämalaun-Lösung eingetaucht und anschließend in zwei PBS-Bädern (je ca. 5 Min.) "geblaut".

80 85 Abschließend werden die Schnitte mit wäßrigem Einbettmittel (z. B. Glycerin-Gelatin, Fa. Merck oder Krystal

Mount, Fa. Biomeda Corp, Foster City, CA) zur Lagerung überschichtet.

Zelllinien, welche die gewünschten Antikörper produzieren, werden expandiert, gesichert und kloniert. Die erhaltenen Klone werden ebenfalls, wie oben beschrieben, analysiert. Die Klone, welche die gewünschten Antikörper produzieren, werden weitergezüchtet und/oder zur Sicherheit weggefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert.

5

Durch dieses Verfahren konnten die erfundungsgemäßen Antikörper "17" und AH18 erhalten werden.

### Beispiel 2

#### Antikörper-Spezifitätstest

10

Um die Spezifität der gemäß Beispiel 1 aus den immortalisierten Zelllinien gewonnenen humanen monoklonalen Antikörpern zu ermitteln, wurde ein Test zur Bindung an primäres Melanom und an Melanom-Metastasen durchgeführt. Die Durchführung des Tests erfolgte wie in Beispiel 1 beschrieben. Dabei wurden mit den erfundungsgemäßen Antikörpern "17" und AH18 die folgenden Ergebnisse erhalten.

15

#### Tabelle 1

| humaner monoklonaler Antikörper | Reaktivität mit Nävi (Zahl positiv/Zahl getestet) | Primäres Melanom | Metastase    | 20 |
|---------------------------------|---|------------------|--------------|----|
| "17"                            | 28/29   | 48/52 (90%)      | 54/54 (100%) |    |
| AH18                            | 23/26   | 48/54 (90%)      | 43/51 (80%)  | 25 |

### Beispiel 3

#### 3.1 Bindefähigkeit des Antikörpers an normales Gewebe

30

Der gemäß Beispiel 1 gewonnene monoklonale Antikörper "17" wurde auf seine Bindefähigkeit mit normalen Geweben getestet. Die Testdurchführung war wie in Beispiel 1.

Der Antikörper wurde auf Reaktivität gegen Gewebe aus Gehirn (Cortex, Pons, Thalamus, Corpus amygdaloideum), Retina, Haut (Keratinozyten, Melanozyten, Langerhans-Zellen, Endothelial-Zellen, glatte Muskulatur, Schweißdrüsen, Nervenfasern), Muskel, Brust, Uterus, Harnblase, Gallenblase, Milz, Niere, Nebenniere, Lunge, Parotis, Darm, Erythrocyten (4 kommerzielle Testproben und 300 Blut-Donoren) und Nebenschilddrüse getestet. Es wurde keine Reaktion des erfundungsgemäßen Antikörpers mit den obigen Gewebearten gefunden.

35

Die Fig. 1 und 2 zeigen die Reaktion des humanen monoklonalen Antikörpers 17 mit einem Gefrierschnitt von primärem Melanom (Fig. 1) bzw. mit normaler Haut (Fig. 2). Ein Vergleich der beiden Figuren zeigt, daß eine Bindung (gekennzeichnet durch Braun- bzw. Dunkelfärbung) des Antikörpers an den Gewebeschnitt nur in Fig. 1 zu beobachten ist.

40

#### 3.2 Bindefähigkeit der Antikörper an andere Tumore

45

Um die weitere Spezifität der gemäß Beispiel 1 aus den immortalisierten Zelllinien gewonnenen humanen monoklonalen Antikörpern zu bestimmen, wurden weitere Tests an Tumorgeweben durchgeführt. Die Durchführung des Tests erfolgte wie im Beispiel 1 beschrieben. Dabei wurden mit den erfundungsgemäßen Antikörpern die folgenden Ergebnisse erhalten:

#### Tabelle 2

50

| Tumor          | Reaktivität mit "17" bzw. AH18<br>Zahl positive/Zahl getestete |
|----------------|--|
| Lungenkarzinom | 10/19  |
| Brustkarzinom  | 4/9  |

55

### Beispiel 4

Die Reaktivität der monoklonalen Antikörper gegen gereinigte Ganglioside wurde weiterhin in einem Immunoblot nach Dünnschichtchromatographie der Ganglioside untersucht.

60

Dafür wurden die Ganglioside GM3, GM2 und GD1a von Boehringer Mannheim GD2 und GD3 von Biocarb, Schwedt, GM1 von Fidia, Italien und GD1b von Pallmann, München verwandt. Die Dünnschichtplatten HPTLC Alu Kieselgel 60 F<sub>254</sub> wurden von Merck bezogen. Das Laufmittel für die Ganglioside bestand aus Chloroform: Methanol:H<sub>2</sub>O (0.02% CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O) 60 : 40 : 9. Als Fixiermittel für die Dünnschichtplatten wurde Polyisobutyl-acrylat (high molecular weight), Aldrich Chemicals, als 0.1%-Lösung in Hexan eingesetzt.

65

## Durchführung

Die Prozedur und Modifikationen davon sind dem Fachmann geläufig und werden hier nur beispielhaft wiedergegeben.

5

## Probenauftrag

Es werden 5 µl einer 1 mg/ml Lösung der Ganglioside aufgetragen. Als Lösungsmittel wurde das oben genannte Laufmittel verwendet. Die Proben wurden z. B. mit einer Hamilton-Spritze auf einem ca. 5 mm breiten Streifen auf der Dünnschichtplatte sukzessive aufgetragen; man läßt dazwischen immer wieder gut an trocknen, damit der Strich möglichst dünn bleibt. Zum Schluß wird die Dünnschichtplatte nochmals gut mit einem Föhn getrocknet. Die Platte wird in eine mit Laufmittel gesättigte Kammer gegeben und man inkubiert, bis das Laufmittel etwa 80% der Platte angefeuchtet hat. Anschließend wird die Platte entnommen und man läßt sie trocknen.

15 Dann wird die Platte in 0.1%iger Polyisobutylacrylat-Lösung für etwa 1 Min geschwenkt.

Man läßt die Platte wiederum trocknen.

Zwecks Blockierung wird die Platte mittels einer Pipette mit einer 1% RSA/PBS (Rinder Serumalbumin, Boehringer Mannheim) Lösung bedeckt (keine Luftblasen lassen!) und ca. 30 Min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wird die Blockierungslösung abgegossen.

20 Anschließend wird 2x mit PBS gewaschen. Dazu wird die Platte in einer Schale mit PBS untergetaucht und ca. je 2 Min stehen gelassen. PBS wurde dazwischen abgesaugt (PBS nie direkt auf die Platte geben; nicht schütteln; Platte nicht austrocknen lassen).

Danach wird die Platte mit MAK-haltiger Lösung (z. B. 1 – 10 µg/ml MAK) überschichtet und für 1 Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen.

25 Anschließend wird 5x mit PBS gewaschen (wie oben beschrieben). Dann wird die Platte mit Konjugat (polyklonales, Peroxidase-markiertes Schaf-Fab-Fragment gegen humanes Fcγ, Konzentration wie beim Gewebestest Beispiel 1) überschichtet und für z. B. 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird 6x mit PBS (wie oben beschrieben) gewaschen. Dann wird Substrat zugegeben und die Platte während der Entwicklung leicht geschwenkt.

30 Als Substrat kommt z. B. in Frage TMB/DONS (Tetramethylbenzidin (TMB) 12 mg + Dioctynatriumsulfosuccinat (DONS) 40 mg in 10 ml Methanol (bei 37°C) lösen und mit 10 ml Zitronensäure/Phosphat-Puffer pH 5.0 (25 ml 0.1 M Zitronensäure, Merck, + 28 ml 0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O, Merck, auf 100 ml) und mit 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) mischen). Es wird solange entwickelt, wie die Negativkontrolle nicht gefärbt wird; dann wird mehrmals mit H<sub>2</sub>O dest gewaschen. Die Platte wird lichtgeschützt getrocknet (falls Entwicklung mit TMB/DONS stattfindet, sofort photographieren, da die Färbung ausbleicht).

35 Führt man mit MAK 17 bzw. mit MAK AH 18 die oben beschriebene Prozedur durch, so erhält man die in Tabelle 4 gezeigten Ergebnisse. Die MAKs 17 und AH 18 reagieren mit GM 3 und GD 3, nicht aber mit GM 1, GM 2, GD 1a, GD 1b und GD 2.

Zur Kontrolle wurden die Ganglioside in einem Parallelversuch durch Anfärbung mit Resorcin sichtbar gemacht. Dazu wird die Platte mit Resorcin-Lösung (Resorcin von Merck, 400 ml + 100 ml H<sub>2</sub>O + 5 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) eingesprührt und für etwa 10 Min im Trockenschrank bei 110°C entwickelt.

40 Diese Kontrolle zeigt, daß von allen Gangliosiden gleiche Mengen auf die Dünnschicht-Platte aufgetragen wurden.

45

## Tabelle 3

## Nachweis der Ganglioside nach Dünnschichtchromatographie

|      | Resorcin | MAK*17* bzw. MAK AH18 |
|------|----------|-----------------------|
| 50   |          |                       |
| GM1  | +        | –                     |
| GM2  | +        | –                     |
| GM3  | +        | +                     |
| 55   |          |                       |
| GD1a | +        | –                     |
| GD1b | +        | –                     |
| GD2  | +        | –                     |
| GD3  | +        | +                     |

60

## Nachweis der Ganglioside nach Dünnschichtchromatographie

Aus Tabelle 3 ist ersichtlich, daß die erfundungsgemäßen Antikörper nur mit bestimmten Gangliosiden reagieren. Von den getesteten Gangliosiden zeigen GM3 und GD3 positive Signale. Es wird keine nennenswerte Reaktivität ( $\leq 5\%$ ) mit den Gangliosiden GM1, GM2, GD1a, GD2 und GD1b gefunden.

65

## Beispiel 5

Reaktivität der Antikörper mit Zelllinien Zellen der zu untersuchenden Zelllinien werden über Nacht in

Terasaki-Platten (erhalten von Fa. Greiner) gezüchtet. Der Kulturüberstand wird von den adhärenten Zellen entfernt und durch die zu untersuchende Antikörperlösung ersetzt. Nach einer 1- bis 2stündigen Inkubation wird die Antikörper-Lösung entfernt, der Zellrasen mehrmals gewaschen und der an die Zellen gebundene monoklonale Antikörper nachgewiesen. Dazu wurden nach dem Waschen mit PBS 100 µl Peroxidase-markierter Schaf-Anti-Human-Leichte-Kette-Antikörper zugegeben und wiederum für 1 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde die Enzymreaktion mit Peroxidasesubstrat (ABTS<sup>®</sup>) gestartet. Nach 10 bis 60 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 406 nm in einem Photometer bestimmt. Alternativ dazu kann auch ein Peroxidasesubstrat wie Aminoethylcarbazol zugegeben werden und nach Beendigung der Reaktion der bräunliche Niederschlag an bzw. auf den Zellen mittels eines Mikroskops ausgewertet werden.

Aus dem in Tabelle 3 dargestellten Ergebnis geht hervor, daß der Antikörper 17 mit Melanom SK-MEL 28 Zellen (ATCC HTB 72) reagieren, während keine Reaktion mit humanen Vorhautfibroblasten gefunden wird (die nach bekannten Verfahren selbst isoliert wurden). Der Antikörper 17 zeigt weiterhin Reaktion mit Insulinom-Zellen RIN (erhalten von Dr. Eisenbart, Josslin Diabetes Center, Boston, Mass. 02 215) und der Neuroblastom-Zellen IMR 32 (ATCC CCL 127).

5

10

15

Tabelle 4

| Antikörper | Antikörper-Reaktivität gegen verschiedene Zelllinien |                    |                          | humane Vorhaut-Fibroblasten | 20 |
|------------|--|--------------------|--------------------------|-----------------------------|----|
|            | SK MEL 28<br>(Melanom)                               | RIN<br>(Insulinom) | IMR 32<br>(Neuroblastom) |                             |    |
| "17"       | ++   | +                  | +                        | --                          | 25 |

## Patentansprüche

1. Antikörper gegen Melanom, dadurch gekennzeichnet, daß er an die Ganglioside GM3 und GD3 bindet, im wesentlichen aber nicht an die Ganglioside GM1, GM2, GD1a, GD1b und GD2 bindet, wobei die Bindung des Antikörpers an die Ganglioside durch Immunfärbung nach dünnenschicht-chromatographischer Auftrennung der Ganglioside bestimmt wurde. 30
2. Antikörper nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß er ein humarer Antikörper ist.
3. Antikörper nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß er ein Antikörper der Klasse IgM ist.
4. Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß er auch an mindestens 70% der Melanom-Metastasen bindet. 35
5. Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß er zusätzlich an Lungenkarzinome oder/und Brustkarzinome binden kann.
6. Antikörper "17", sekretiert von der Hybridomzelllinie ECACC 9 00 90 703.
7. Antikörper AH18, sekretiert von der Hybridomzelllinie ECACC 9 00 90 701. 40
8. Verfahren zur Herstellung von gegen Melanom gerichteten Antikörpern nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß man ohne vorherige Immunisierung B-Lymphozyten aus einer gesunden Person isoliert, die isolierten B-Lymphozyten immortalisiert, Antikörper aus den immortalisierten B-Lymphozyten durch immunhistochemische Analyse auf Bindung gegen primäres Melanom oder/und Melanom-Metastasen untersucht, die positiv reagierenden B-Lymphozyten-Klone auswählt, kultiviert und daraus monoklonale Antikörper gewinnt. 45
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß man als B-Lymphozyten-Donor eine gesunde Melanom-Risikoperson auswählt.
10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß man die Immortalisierung der B-Lymphozyten durch Fusion mit Myelom-Zellen humaner oder muriner Herkunft oder mit Heteromyelomen durchführt. 50
11. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß man die Immortalisierung der B-Lymphozyten durch Transformation mit Epstein-Barr-Virus durchführt.
12. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß man die Immortalisierung der B-Lymphozyten durch Fusionierung mit subzellulären Vesikeln, die eine transformierende DNA enthalten, durchführt. 55
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß man die immunhistochemische Analyse der Antikörper durch Bindung an Melanom in Gewebeschnitten mittels eines ELISA-Tests durchführt.
14. Derivat eines Antikörpers nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß es dieselbe Bindungsspezifität wie ein Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 7 besitzt und sich von dem Antikörper 60

  - 1) durch Austausch von nicht für die Bindungsspezifität des Antikörpers verantwortlichen Domänen unterscheidet oder/und
  - 2) mit einem anderen Molekül verknüpft ist. 65

15. Verwendung eines Antikörpers oder Antikörperderivats nach einem der Ansprüche 1 bis 7 oder 14 zur Diagnose oder Therapie von Tumoren, insbesondere Melanomen.
16. Verwendung nach Anspruch 15, worin man den von der Zelllinie ECACC 9 00 90 703 sekretierten

Antikörper "17" oder/und den von der Zelllinie ECACC 9 00 90 701 sekretierten Antikörper AH18 einsetzt.  
17. Arzneimittel, dadurch gekennzeichnet, daß es aus einem oder mehreren Antikörpern oder Antikörper-  
derivaten nach einem der Ansprüche 1 bis 7 oder 14, gegebenenfalls zusammen mit üblichen pharmazeuti-  
schen Träger-, Hilfs-, Füll- und Zusatzstoffen besteht.

5 18. Verfahren zur Diagnose oder Therapie von Tumoren, insbesondere Melanomen, dadurch gekennzeich-  
net, daß man einen oder mehrere Antikörper oder Antikörperderivate nach einem der Ansprüche 1 bis 7  
oder 14, gegebenenfalls zusammen mit üblichen pharmazeutischen Träger-, Hilfs-, Füll- und Zusatzstoffen  
verabreicht.

10

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

**—Leerseite—**



Fig. 1: Der h MAK 17 reagiert stark mit einem primären Melanom (Gefrierschnitt); Erklärung s. Beispiele 1 bis 3.

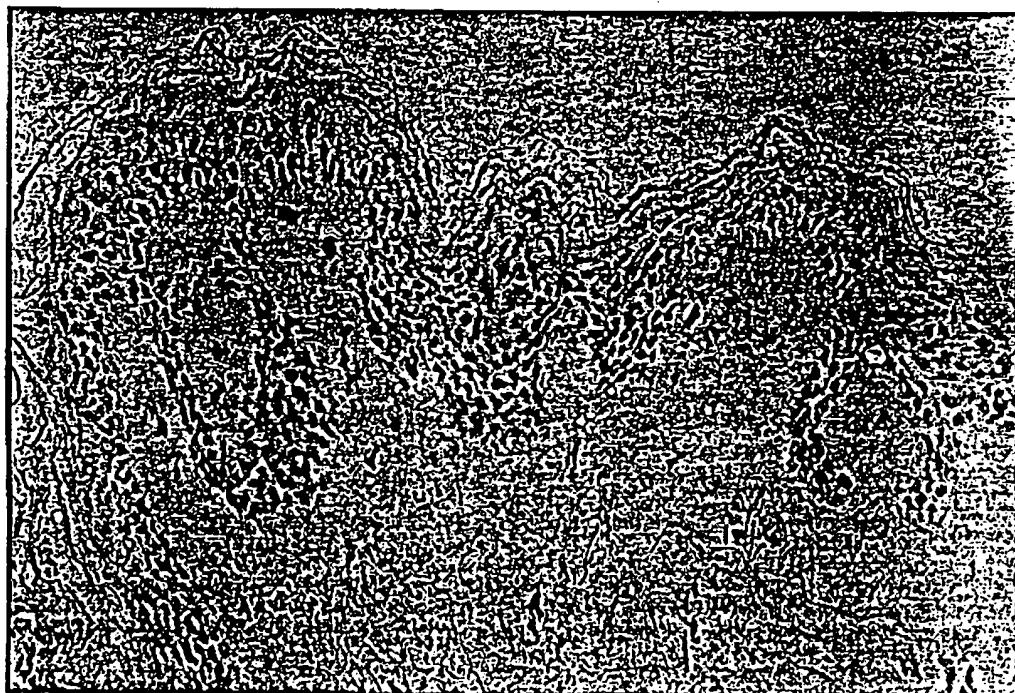


Fig. 2: Keine Reaktion des h MAKs 17 mit normaler Haut (Gefrierschnitt); Erklärung siehe Beispiele 1 bis 3

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**